

MS 10310030087
10310030086

FluoCon

IgG/IgM

*Antigamaglobulina G/M marcada
com isotiocianato de fluoresceína.*

IgG - Cód. 112-I: 1 ml

IgM - Cód. 113-I: 1 ml



WAMA Diagnóstica

Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT
CEP 13560-971 - São Carlos - SP

Fone (16) 3377.9977 / Fax (16) 3377.9970
www.wamadiagnostica.com.br

FluoCon IgG/IgM

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

A técnica de imunofluorescência é um método histoquímico capaz de identificar substâncias antigênicas em tecidos ou no interior das células, bem como revelar anticorpos dirigidos contra antígenos conhecidos.

Os dois principais métodos utilizados no estudo da imunofluorescência são:

1. Imunofluorescência Direta: onde um anticorpo específico para um determinado antígeno é marcado e aplicado diretamente ao substrato. Geralmente utilizada na identificação de microrganismos, tais como: *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans* etc.

2. Imunofluorescência Indireta: onde o anticorpo não marcado se aplica diretamente sobre a preparação e é revelado pela aplicação de uma antigamaglobulina marcada. É mais sensível que a direta e frequentemente utilizada para a demonstração de anticorpos antimicrobianos (Sífilis, Toxoplasmose, Doença de Chagas etc.), bem como para a detecção de autoanticorpos (ANA, Anti-DNA etc).

APRESENTAÇÃO DO KIT

CÓD. 112-I (1 x 1 ml)

FluoCon G: antigamaglobulina G marcada com isotiocianato de fluoresceína. Obtida de carneiro.

CÓD. 113-I (1 x 1 ml)

FluoCon M: antigamaglobulina M marcada com isotiocianato de fluoresceína. Obtida de carneiro.

CARACTERÍSTICAS DO CONJUGADO

Os conjugados FluoCon são preparados a partir de anticorpos antiglobulinas humanas obtidos de carneiro e purificados por afinidade. Este anticorpo é então conjugado com isotiocianato de fluoresceína e o fluorocromo livre é removido por filtração em gel (Sephadex G 25). Para garantir uma relação Fluorocromo/Proteína (F/P) ótima, é realizada posterior purificação por cromatografia de troca iônica.

Características do conjugado:

- Relação F/P = 2.8 - 3.3
- Relação D.O. (DO_{493} / DO_{276}) = $0,78 \pm 0,05$
- Conservativo = Azida Sódica a 0,1%

As diluições de trabalho devem ser determinadas por cada laboratório para cada antígeno utilizado. Recomenda-se que a cada novo lote uma nova diluição de trabalho seja determinada (observe item procedimento). Isto é necessário, pois a diluição ideal do conjugado está relacionada com as condições de trabalho do laboratório, microscópio de fluorescência, objetiva, tipo de iluminação, antígeno utilizado etc.

ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE

O conjugado fluorescente FluoCon deve ser armazenado a temperatura entre 2 e 8°C, onde permanecerá estável até a data de validade (vide etiqueta). Não deve ser congelado. Pode ocorrer leve precipitação, que pode ser removida por centrifugação, sem alterar seu desempenho. Após diluído para uso, deve ser armazenado entre 2 e 8°C e usado dentro de 10 horas.

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Microscópio de fluorescência;
- Pipetas sorológicas;
- Jarra Coplin ou similar;
- Tubos e rack de ponteiras;
- PBS;
- Câmara de incubação;
- Papel absorvente;
- Recipiente para descarte de material.

PROCEDIMENTO

Determinação da Diluição de Trabalho

A diluição de trabalho deve ser determinada para cada antígeno utilizado.

Por exemplo: *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, Células HEP-2, *Chitidia luciliae* etc.

Tomando como exemplo o antígeno *Toxoplasma gondii*, o seguinte procedimento deve ser utilizado para se determinar a diluição ideal do conjugado para este antígeno.

1. Fazer diluições 1/50, 1/100, 1/200, 1/300 e 1/400 do conjugado em tampão PBS com Azul de Evans a 1%, conforme o seguinte esquema (quantidades em ml):

TUBOS	1	2	3	4	5
PBS	2.5	1.0	1.0	1.0	1.0
CONJUGADO	0.05	-	-	-	-
TRANSFERIR		1.0	1.0	0.2	1.0
DILUIÇÃO	1/50	1/100	1/200	1/300	1/400

2. Fazer diluições de um soro controle positivo, de título conhecido, em tampão PBS. Supondo um soro positivo, com título 1/256, fazer as seguintes diluições (quantidades em ml):

TUBOS	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1000
PBS	0.75	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
CONJUGADO	0.05	-	-	-	-	-	-
TRANSFERIR		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

OBS.: Usar para a realização do teste a partir da diluição 1/32. Diluir um soro controle negativo a 1/32 com tampão PBS.

3. Usar para cada diluição do conjugado uma lâmina do antígeno (no caso *Toxoplasma gondii*); a qual se aplicará na área 1, 1 gota da diluição 1/32 do controle negativo; na área 2, 1 gota do tampão PBS (para controle da fluorescência do conjugado); e a seguir pingar 1 gota do soro controle positivo conhecido em cada área reativa a partir da diluição 1/32 até 1/1000.

4. Incubar as lâminas por 30 minutos em câmara úmida, em temperatura ambiente.

5. Lavar com PBS usando uma pisseta (frasco plástico gotejador) ou uma pipeta, tendo o cuidado de não dirigir o fluxo diretamente as áreas reativas.

6. Colocar as lâminas em uma jarra de Coplin ou similar e lavar 3 vezes com PBS, 5 minutos cada vez, agitando suavemente o Coplin durante a lavagem.

7. Retirar as lâminas do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS sacudindo-as sobre o papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas sem deixar secar o local da reação.

8. Retornar à câmara úmida.

9. Pingar 1 gota do conjugado diluído (conforme item 1) em cada área reativa (1 lâmina para cada diluição do conjugado), tendo o cuidado de cobri-las totalmente.

10. Incubar 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente, protegendo do excesso de luz.

FluoCon IgG/IgM

11. Repetir as etapas 5, 6 e 7.

12. Pingar 3 a 4 gotas de glicerina tamponada entre as áreas reativas. Cobrir as lâminas com lamínulas, evitando a formação de bolhas. Secar o excesso da glicerina com papel absorvente.

Limpar o dorso da lâmina.

13. Ler em microscópio de fluorescência. É conveniente fazer a leitura no mesmo dia. Entretanto, no caso de não ser possível, conservá-las em câmara úmida em geladeira (2 a 8°C), protegidas da luz e lê-las no dia seguinte. A glicerina não deve secar. Se isto ocorrer colocar mais glicerina.

RESULTADO DAS LEITURAS

Reação Negativa: AUSÊNCIA de fluorescência amarelo-esverdeada em todo o contorno do toxoplasma. Os parasitas exibem uma coloração avermelhada. O controle negativo PBS (controle do conjugado) deve apresentar uma reação negativa.

Reação Positiva: PRESENÇA de fluorescência amarelo-esverdeada em todo o contorno do toxoplasma. O soro em questão deverá apresentar uma reação positiva até a diluição 1/256 (de acordo com exemplo do item 2 - Procedimento).

INTERPRETAÇÃO

O título do conjugado será a maior diluição que mostrar positividade até o título do soro previamente conhecido (no caso em questão, o título do soro é 1/256).

Ao fazer a leitura das lâminas deve-se anotar a intensidade da fluorescência de 1 a 4 cruzes (+ a + + + +). Verifique no quadro abaixo a marcação da intensidade da fluorescência de acordo com a diluição do soro e a determinação do título ideal do conjugado:

SORO \ CONJUGADO	CONTROLE POSITIVO CONJUGADO							TÍTULO
	1:0	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
1:50	++--	+++	--	+	+	+	H	1
1:100	++--	+++	--	+	+	+	H	1
1:200	+++	++	+	H	+	+	H	1
1:300	+++	++	+	H	+	+	H	1
1:400	+-	+	+	H	+	+	H	1

Portanto, a maior diluição do conjugado que apresenta fluorescência até a diluição 1/256 (título conhecido do soro positivo) é 1/100. Esta é a diluição ideal de trabalho quando se utiliza como antígeno o *Toxoplasma gondii* (exemplo proposto). Este mesmo procedimento se fará com todos os antígenos utilizados.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

1. Conservar o reagente entre 2 a 8°C. **Não congelar.**
2. Seguir as boas práticas laboratoriais (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

BIBLIOGRAFIA

1. Camargo, M. E.; Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev. Bras. Pat. Clin. 10(3): 87-107, 1974.
2. Camargo, M. E.; Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev. Bras. Pat. Clin. 10(4): 143-169, 1974.
3. Clark, H. F. and Shepard, C. C.: A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. *Virology*, 20:642, 1963.
4. Catty, D. and Johnson, G. D.: Immunofluorescence: Preparation of fluorescent reagents. *Antibodies: A Practical Approach*. Volume II. IRL Press - Oxford University Press, 1990.
5. Dedmon, R. E.; Holmes, A. W. and Deinhardt, F.: Preparation of fluorescein isothiocyanate-labeled gamma globulin by dialysis, gel filtration and ion-exchange chromatography in combination. *J. Bact.* 89:734, 1965.
6. The, T. H. and Feltkamp, T. E.: Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. *Immunology*, 18:865, 1970.

V EDIÇÃO / REV: 10/2006

TERMO DE GARANTIA

A *WAMA Diagnóstica* garante a troca deste conjunto diagnóstico, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e que seja comprovado por sua assessoria técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A *WAMA* e seus distribuidores não se responsabilizam por falhas no desempenho do kit sob essas condições.